

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

20 SEP. 2000



Original

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/655		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/11032
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. März 2000 (02.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06131		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99)			
(30) Prioritätsdaten: PCT/EP98/05306 20. August 1998 (20.08.98) EP			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPE- GEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOL- OGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRO- DUKTION MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Hei- delberg (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Günther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemünd (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- richts: 14. September 2000 (14.09.00)	
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOSTATIN (TT-232 TRIACETATE) AND ANALOGS THEREOF			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOSTATIN (TT-232 TRIACETAT) UND SEINE ANALOGA			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for synthesising biostatin (TT 232) by means of solid phase synthesis on a polymer support, by gradually building up the peptide using amino acids derivatized with protective groups. According to said method, the protective groups are split off and the peptide is detached from the solid phase. The disulphide bond is closed through the oxidation of the completely or partially built up peptide in the presence of a suitable solvent for as long as the peptide remains bound to the solid phase. The invention also relates to a method for synthesising biostatin (TT232) by means of peptide synthesis in solution.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt. Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/06131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/655

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30 September 1992 (1992-09-30) cited in the application see especially the synthesis described in example 1 together with example 3 ---	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 19, 11 May 1998 (1998-05-11) Columbus, Ohio, US; abstract no. 230702, H UNO & S KANAOKA: "preparation of cyclic peptides" XP002103315 & JP 10 067796 A (SUMITOMO) 10 March 1998 (1998-03-10) abstract --- -/--	1-5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2000

Date of mailing of the international search report

28/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. l. onal Application No

PCT/EP 99/06131

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 44, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP the whole document	1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., vol. 30, no. 18, 1989, pages 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB the whole document	1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15 October 1980 (1980-10-15) the whole document	11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06131

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/06131

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 505680	A	30-09-1992	HU 60752 A	28-10-1992
			AT 121753 T	15-05-1995
			CA 2060034 A	26-07-1992
			DE 69202182 D	01-06-1995
			DE 69202182 T	31-08-1995
			ES 2074294 T	01-09-1995
			FI 920340 A	26-07-1992
			JP 2514518 B	10-07-1996
			JP 5163299 A	29-06-1993
			US 5480870 A	02-01-1996
JP 10067796	A	10-03-1998	NONE	
EP 17536	A	15-10-1980	FR 2451915 A	17-10-1980
			CA 1137467 A	14-12-1982
			DE 3062396 D	28-04-1983
			JP 55162754 A	18-12-1980
			US 4337194 A	29-06-1982

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/655

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ¹	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30. September 1992 (1992-09-30) in der Anmeldung erwähnt see especially the synthesis described in example 1 together with example 3 ---	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 19, 11. Mai 1998 (1998-05-11) Columbus, Ohio, US; abstract no. 230702, H UNO & S KANAOKA: "preparation of cyclic peptides" XP002103315 & JP 10 067796 A (SUMITOMO) 10. März 1998 (1998-03-10) Zusammenfassung --- -/--	1-5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie¹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruchs Nr.
Y	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 44, Nr. 5, Mai 1996 (1996-05), Seiten 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP das ganze Dokument	1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., Bd. 30, Nr. 18, 1989, Seiten 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB das ganze Dokument	1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15. Oktober 1980 (1980-10-15) das ganze Dokument	11-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 505680 A	30-09-1992	HU 60752 A	28-10-1992
		AT 121753 T	15-05-1995
		CA 2060034 A	26-07-1992
		DE 69202182 D	01-06-1995
		DE 69202182 T	31-08-1995
		ES 2074294 T	01-09-1995
		FI 920340 A	26-07-1992
		JP 2514518 B	10-07-1996
		JP 5163299 A	29-06-1993
		US 5480870 A	02-01-1996
JP 10067796 A	10-03-1998	KEINE	
EP 17536 A	15-10-1980	FR 2451915 A	17-10-1980
		CA 1137467 A	14-12-1982
		DE 3062396 D	28-04-1983
		JP 55162754 A	18-12-1980
		US 4337194 A	29-06-1982

M.H

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/655	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/11032 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. März 2000 (02.03.00)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06131 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99) (30) Prioritätsdaten: PCT/EP98/05306 20. August 1998 (20.08.98) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPE- GEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOL- OGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRO- DUKTION MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Hei- delberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Günther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemünd (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE). </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> (81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06131 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99) (30) Prioritätsdaten: PCT/EP98/05306 20. August 1998 (20.08.98) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPE- GEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOL- OGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRO- DUKTION MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Hei- delberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Günther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemünd (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06131 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99) (30) Prioritätsdaten: PCT/EP98/05306 20. August 1998 (20.08.98) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPE- GEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOL- OGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRO- DUKTION MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Hei- delberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Günther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemünd (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>			
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOSTATIN (TT-232 TRIACETATE) AND ANALOGS THEREOF (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOSTATIN (TT-232 TRIACETAT) UND SEINE ANALOGA (57) Abstract <p>The invention relates to a method for synthesising biostatin (TT-232) by means of solid phase synthesis on a polymer support, by gradually building up the peptide using amino acids derivatized with protective groups. According to said method, the protective groups are split off and the peptide is detached from the solid phase. The disulphide bond is closed through the oxidation of the completely or partially synthesised peptide in the presence of a suitable solvent for as long as the peptide remains bound to the solid phase.</p>				
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird, solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren zur Herstellung von BIOSTATIN (TT-232 Triac tat)
und seine Analoga**

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin mittels Festphasensynthese.

10

Zur Synthese von Peptiden sind dem Fachmann verschiedene Verfahren bekannt. Es handelt sich dabei zum einen um Flüssigphasenmethoden, welche auf Shemyakin (Tetrahedron Lett. (1965), 2323 f.) zurückgehen, und zum anderen um Festphasenverfahren, welche erstmals von Merrifield (R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2149) beschrieben wurden.

15

20

25

Die Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasensynthese sind seither weiterentwickelt und erheblich verbessert worden, es wird hierzu beispielsweise auf "Peptide, Chemie und Biologie", Hans Dieter Jakubke, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford, 1996, ISBN 3-8274-0000-7 verwiesen. Dieses Lehrbuch beschreibt Methoden der klassischen als auch der Merrifield-Peptid-Synthese. Derzeit wird zur Peptidsynthese in erster Linie die Peptidsynthese in Lösung angewandt. Insbesondere bei der Synthese von Peptiden, welche mindestens eine Disulfidbrücke ausbilden sollen, besteht im Hinblick auf die Synthese in Lösung allerdings der der Methode inhärente Nachteil, daß diese Disulfidbrücke durch Oxidation in hoher Verdünnung gebildet werden muß. Dies ist im klassischen Verfahren der Peptidsynthese in Lösung nötig, um die erforderliche örtliche Trennung der einzelnen Reaktionszentren zu bewirken und damit eine effektive Cyclisierung zu ermöglichen.

30

Das Peptid Biostatin (TT-232) ist ein Analogon des Somatostatins und weist starke in vitro und in vivo Antitumoraktivität auf.

Somatostatin ist ein natürlich vorkommendes Tetradecapeptid, welches die Bildung von Wachstumshormon und die Sekretion weiterer endokriner Moleküle, wie z.B. Glucagon, Insulin und Gastrin, inhibiert. Somatostatin inhibiert oder reguliert einige Zellfunktionen und es wurde darüber hinaus
5 festgestellt, daß es wichtige endogene antiproliferative Aktivität entfaltet. Es wurde außerdem ein inhibitorischer Effekt von Somatostatin und seinen Analoga auf Tumoren gezeigt. In den letzten Jahren wurden einige Somatostatinanaloga entwickelt, welche längere Wirkungszeiten als das native Hormon und bessere Antitumorwirksamkeit aufweisen. Es wurde
10 daher viel Mühe aufgewandt, tumorselektive Somatostatinanaloga zu entwickeln, wobei insbesondere auch die leichte Herstellbarkeit eine Rolle spielt.

Eines dieser Analoga ist ein Molekül mit einer 5-Ringstruktur mit der
15 folgenden Sequenz:

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂.

Das Molekül wurde TT-232 bzw. Biostatin genannt. Dieses Somatostatin-analogon hat praktisch keinen inhibitorischen Effekt auf die Wachstumshormonsfreisetzung, zeigt aber starke Antitumorwirksamkeit in vivo und in vitro
20 und induziert die Apoptose. Die Verbindung inhibiert die Tyrosinkinase-Aktivität verschiedener menschlicher Darmtumorzelllinien, wobei diese Inhibition sehr gut mit der beobachteten Inhibition der Zellproliferation übereinstimmte.

25 Die Herstellung von Octa- bzw. Heptapeptid-Derivaten wird beispielsweise in der EP-A-O 505 680 beschrieben. Dort wird aber für eine effektive Cyclisierung über die beiden Cystein-Reste das Peptid zuerst von der festen Phase abgetrennt, die Lösung stark verdünnt und dann die Oxidation
30 bewirkt. Diese Art der Herstellung erfordert aber weitere Aufkonzentrations- und Reinigungsschritte.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Verfahren bereitzustellen, durch welches Biostatin besonders leicht und mit besonders hoher Ausbeute an freigesetztem Peptidamid nach der Disulfidoxidation erhalten werden kann.

5

Eine weitere Aufgabe war es, die Herstellung von Biostatin in einer solchen Weise zu ermöglichen, daß eine leichte Aufarbeitung des erhaltenen Produkts erfolgen kann.

10 Gelöst werden diese Aufgaben zur Synthese von Biostatin (TT 232) in einem ersten erfindungsgemäßen Verfahren durch Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst
15 wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.

20 Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens angewandte Festphasensynthese kann in dem Fachmann an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Die hierfür geeigneten Festphasenmaterialien, die benötigten Reagenzien, Puffer, Reaktionsbedingungen und einzusetzenden Schutzgruppen für die Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert auf der Feststellung, daß die örtliche Trennung der Reaktionszentren bei der Bildung der Disulfidbrücken in Biostatin in ausreichender Weise gewährleistet ist, wenn die Oxidation erfolgt, solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden ist.

30

Im Rahmen der Erfindung ist es sowohl möglich, direkt nach Synthese desjenigen Teils von Biostatin, welcher die zu verbrückenden Sulfhydryl-

gruppen enthält, eine Oxidation und damit Ausbildung der Disulfidbrücke zu bewirken, und dann das Peptid fertig zu synthetisieren, als auch zuerst das vollständige Peptid zu synthetisieren und danach die Oxidation durchzuführen. Maßgeblich ist jedoch, daß die Oxidation erfolgen muß, solange das
5 Peptid festphasen-gebunden vorliegt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen des Peptids durchzuführen.

10 Zur Oxidation können alle auch bisher bereits für in Lösung durchgeführte Verfahren bekannte Oxidationsmittel eingesetzt werden. Geeignete Oxidationsmittel sind dem Fachmann daher bekannt. Beispiele für derartige Oxidationsmittel sind Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalze, Jod, Peroxide oder Sauerstoff. Diese Oxidationsmittel werden in Gegenwart eines
15 geeigneten Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches angewandt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird besonders bevorzugt als Oxidationsmittel Jod, beispielsweise in essigsaurer Lösung oder in einem Lösungsmittel auf Basis von N,N-Dimethylformamid eingesetzt.

20

Nach abgeschlossener Oxidation erfolgen Waschungen des polymergebundenen Peptids mit verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen. Hierzu können z.B. N,N-Dimethylformamid, Methanol, Essigsäure und Wasser oder aber auch Lösungen von komplexierenden Reagenzien oder
25 Reduktionsmitteln, wie insbesondere Thiosulfat oder Ascorbinsäure eingesetzt werden.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft an einer festen Phase durchgeführt, welche eine säurelabile Ankergruppe (acid labile anchoring bond, ALAB) aufweist. Besonders bevorzugt wird als feste Phase ein Polymer, insbesondere Polystyrol, eingesetzt. Vorteilhaft können auch modifizierte Harze verwendet werden, wie Aminomethylpolystyrol (AMPS),

Benzhydrylamin-(BHA-PS) und Methylbenzhydrolamino-polystyrol (MBHA-PS). Die feste Phase kann dabei in für die Festphasensynthese üblicher Form eingesetzt werden. Bevorzugt wird die Festphase in Form von Kügelchen, sogenannter "Beads", eingesetzt.

5

Geeignete Ankergruppen sind in der Festphasenchemie übliche Anker, welche die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger in einfacher Weise erlauben. Besonders bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung Ankergruppen, welche die Abspaltung des Peptids als Amid ermöglichen.

10 Beispielhafte mit einer säurelabilen Ankergruppe derivatisierte Polymere (ALAB-P) sind 5-(9-amino)xanthen-2-yl-oxyveryl-4'-methyl-benzhydrylamino-polystyrol und 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-aminomethyl-phenoxyacetyl-4''-methyl benzhydrylamino-polystyrol.

15 Besonders bevorzugte Ankergruppierungen sind desweiteren 4-Hydroxymethyl-benzoesäure (HBMA), 9-Amino-xanthenyl-3-hydrol (Xant) oder p[(R,5)- α -(1-(9H-Fluoren-9-yl)methoxyformamido)-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxy-essigsäure [MEOBP]. Am meisten bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung die Xant- und die MEOBP-Gruppierung.

20

Die Synthese wird im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt mit der Fmoc-/tert. Butyl-Strategie durchgeführt. Dies bedeutet, daß die zum Aufbau des Peptids benötigten Aminosäuren an der Aminogruppe mit einer Fmoc-Schutzgruppe und an den Seitenkettengruppierungen mit tert. Butylgruppen derivatisiert sind. Die Fmoc-Schutzgruppe ist dabei eine temporäre Schutzgruppe, da sie bei der Ausbildung des Peptids abgespalten wird, und lediglich eine Fmoc-Gruppe am N-Terminus des synthetisierten, festphasengebundenen Peptids verbleibt.

25

30 Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine werden vorteilhaft mit Trityl- oder Acmschutzgruppen derivatisiert. Es ist außerdem besonders bevorzugt, die N-

terminal letzte Aminosäure im Sequenzaufbau als N-alpha Boc-geschütztes Aminosäurederivat einzusetzen.

5 Im Rahmen des erfindungsgemäßen Syntheseverfahrens werden die folgenden Schritte durchlaufen:

1. Beladung des polymeren Trägers mit dem Anker und/oder dem ersten Aminosäurederivat
2. Aufbau der Peptidsequenz
- 10 3. Knüpfung der Disulfidbrücke
4. Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger und/oder der Schutzgruppenabspaltung
5. Schutzgruppenabspaltung (sofern nicht bereits unter 4. erfolgt).

15 Zur Abspaltung der im synthetisierten Peptid enthaltenen Schutzgruppen können literaturbekannte Methoden, z.B. Zugabe von verdünnter Piperidinlösung, angewandt werden.

20 Die Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls nach an sich bekannten Methoden. Im Fall der säurelabilen Ankergruppen erfolgt die Abspaltung sauer, besonders bevorzugt mit konzentrierter oder verdünnter Trifluoressigsäure.

25 Die Abspaltung der Schutzgruppen der von der Festphase gelösten Peptide erfolgt in der Regel ebenfalls durch Säurezugabe, bevorzugt wiederum mittels Trifluoressigsäure. Nach der Abspaltung der Peptide können gewünschtenfalls weitere Reinigungs- oder/und Konzentrationsschritte durchgeführt werden. Eine Reinigung kann hierbei vorteilhaft mittels präparativer HPLC erfolgen.

30

Die Synthese gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geht in einer besonders bevorzugten Ausführungsform von Fmoc-Threonin(tert.butyl-

ether)amid aus, welches kovalent an eine Polystyrol-Festphase über eine säurelabile Xanthenyl-Ankergruppierung gebunden ist.

In der Folge werden die einzelnen geschützten Aminosäuren zugegeben
5 unter Bildung eines Festphasen-gebundenen geschützten Peptids. Zur
Ausbildung der Disulfidbrücke wird das Heptapeptid sodann an der
Festphase durch Zugabe von Jod/N,N-Dimethylformamid oder Essigsäure
oxidiert und das cyclisierte Heptapeptid durch Säurebehandlung vom Träger
abgelöst. Gleichzeitig werden alle Schutzgruppen an Seitenketten des
10 Peptids abgespalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur
Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch
stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen
15 derivatisierten Aminosäuren, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des
vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines
geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach
Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen des Produkts
erhalten wird.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine im Vergleich zum Stand
der Technik sehr effektive und einfache Herstellung von Biostatin mittels
Peptidsynthese in Lösung. Insbesondere bei der bevorzugten Verfahrens-
führung unter Verwendung von mit Ddz (3,5-Dimethoxybenzyl- α,α -dimethyl-
25 oxycarbonyl oder 2[(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-oxycarbonyl]-propyl) als
Schutzgruppe derivatisierten Aminosäuren zum Peptidaufbau können hohe
Ausbeuten des Produkts auf einfache Weise erhalten werden. Das
erfindungsgemäße Verfahren weist außerdem den Vorteil auf, daß nach
vollendetem Peptidaufbau in leichter Weise die Oxidation erfolgen kann. Es
30 ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt, die Oxidation vor
Abspaltung aller Schutzgruppen durchzuführen, allerdings ist eine
Verfahrensführung mit Abspaltung der Schutzgruppen vor der Oxidation

ebenfalls möglich, auch wenn die Ausbeuten mit dieser Variante etwas geringer sind.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß
5 nach erfolgter Oxidation und damit intramolekularem Ringschluß über die
beiden Cystein-Reste die Reaktionslösung abgedampft werden kann und auf
diese Art und Weise das Produkt erhalten wird. Gegebenenfalls wird das
Produkt noch gewaschen, z.B. mit Ether, und danach erneut abgesaugt und
getrocknet.

10 Im erfindungsgemäßen Verfahren sind vorzugsweise die folgenden
Syntheseschritte nacheinander durchzuführen:

1. Kopplung von Ddz-geschütztem Cys (Acm) an tert.-Butyl-geschütztes
Treonin
- 15 2. Ersatz der Schutzgruppe Ddz durch Trifluoressigsäure,
3. Anfügen eines Ddz-geschützten Lysin (Z),
4. Ersatz der Ddz-Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure
5. Anfügung des Ddz-geschützten D-Trp
6. Entfernung der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
- 20 7. Anfügung des Ddz-geschützten Tyr (Tbu)
8. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe und Ersatz durch Trifluoressigsäure
9. Anfügen des Ddz-geschützten Cys (Acm)
10. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
11. Anfügen des Boc-geschützten D-Phe
- 25 12. Ersatz des Boc durch Trifluoressigsäure
13. Oxidation und Aufarbeitung des Produkts durch Abdampfen des
Lösungsmittels und Waschen.

30 In bevorzugten Ausführungsformen wird die Oxidation mit dem voll
geschützten Peptid durchgeführt, wogegen in der anderen Ausführungsform
in Schritt 11 teilweise bereits die Schutzgruppen entfernt werden, so daß
lediglich die Acm-Gruppen am Cystein verbleiben.

Das erfindungsgemäße Verfahren, welches ein zweiter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, ermöglicht eine einfache Peptidsynthese in Lösung, bei der sowohl die Oxidation als auch die Aufarbeitung sehr leicht durchzuführen sind. Durch Oxidation des noch tert.-Butyl-geschützten Biostatins wird eine besonders hohe Ausbeute von ca. 70 bis 80 % der Theorie erhalten.

Weitere Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens können aus den Beispielen 4 und 5 ersehen werden.

10

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern.

Beispiel 1:

15 Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

395g Fmoc-MEOBP-MBHA-Harz (Beladung 0,84 mmol/g) werden unter Verwendung von 1,5 l N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt und durch Taumeln gemischt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Die Taumbewegung wird während aller Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 1,5 l N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 30 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

30

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 267,1 g (672 mmol) Fmoc-Thr(tBu) in 375 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 375 N.N-Dimethylformamid, 104,4g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol) Fmoc-Cys(Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol)

HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie
5 Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

10 Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5)
15 werden folgende Lösungen vorbereitet: 314,9 g (672 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von
20 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 157,4 g (336 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol)
25 HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es
30 werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

5 Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden folgende Lösungen vorbereitet: 286,8 g (672 mmol) Fmoc-D-Trp in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml
10 N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der
15 Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 143,3 g (336 mmol) Fmoc-D-Trp in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß
20 gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

25 Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden folgende Lösungen vorbereitet: 308,8 g (672 mmol) Fmoc-Tyr(tBu)

in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 154,4 g (336 mmol) Fmoc-Tyr(tBu) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol)

- 14 -

Fmoc-Cys (Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBT*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten

Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 178,3 g (672 mmol) Boc-D-Phe in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBT*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 89,1 g (336 mmol) Boc-D-Phe in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBT*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 400 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 15, Umsetzung mit Boc_2O

Das aus Stufe 14 resultierende Produkt wird mit 4 l N.N-Dimethylformamid versetzt und 20 Minuten agitiert. Dann werden 400 g Boc_2O zugegeben, nach 5 Minuten werden in 5 Minuten Abstand 3 Portionen DIEA a 200 ml zugegeben. Nach 1000 Minuten wird abgesaugt, es folgen 5 DMF-Waschschritte (s.o.) a 3 l und 3 analoge MeOH-Waschschritte wobei jeweils 2,5 l MeOH eingesetzt werden. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 833 g polymergebundenes Peptid erhalten.

Stufe 16, Knüpfung der Disulfidbrücke

Zu 833 g polymergebundenem Peptid (0,37 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 15 wird eine Lösung von 416,5 g Jod in 6 l N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 8 l N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 8 l. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l 10 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 Waschschritte mit einer Mischung aus 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l Wasser sowie 2 DMF-Waschschritte a 8 l. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 672,4 g (0,45 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) .

Stufe 17, Abspaltung vom Polymer

Zu 672,4 g polymergebundenem Peptid aus Stufe 16 wird eine Lösung von je 120 ml m-Cresol und Wasser in 6 l Trifluoressigsäure (Abspaltreagenz) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach saugt man ab und versetzt das Harz erneut mit Abspaltreagenz. Die erste Nachspaltung wird nach 30 Minuten abgesaugt, es folgen Nachspaltungen

- 16 -

von einer bzw. zwei Stunden Dauer. Die jeweiligen Filtrate werden am Rotationsverdampfer bei 30°C Wasserbadtemperatur im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der Rückstand wird mit 3 l Ether verrührt, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 1,5 l Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden insgesamt 231,85 g Peptid erhalten.

Ausbeute: 13,4% d.Th. über alle Stufen, 14,8% bezogen auf die Abspaltung

Beispiel 2:

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

3,64 g Fmoc-XANT-Harz (Beladung 0,55 mmol/g) werden unter Verwendung von 25 ml N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt, geschüttelt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Das Schütteln wird während allen Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 25 ml N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 25 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden 2,39 g (6 mmol) Fmoc-Thr(tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt·H₂O und

2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

- Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

- Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys (Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

- Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5) werden 2,81 g (6 mmol) Fmoc-Lys(Boc), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und

2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 mL (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden 2,56 g (6 mmol) Fmoc-D-Trp, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden 2,76 g (6 mmol) Fmoc-Tyr (tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer

(Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

5

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

10 Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 11) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys(Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese
15 Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

20

Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

25 Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 13) werden 1,59 g (6 mmol) Boc-D-Phe, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese
30 Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 13) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen

- 20 -

und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 15, Knüpfung der Disulfidbrücke

5

Zu 5 g polymergebundenem Peptid (0,30 mMol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 14 wird eine Lösung von 2,5 g Jod in 50 ml N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 50 ml N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 50 ml. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 16 ml N.N-Dimethylformamid und 4 ml 10 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 DMF-Waschschritte. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 4,1 g (0,34 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

15

Stufe 16, Abspaltung vom Polymer und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen

1 g polymergebundenes Peptid werden 10 mal für je 10 Minuten mit jeweils 5 ml 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan versetzt. Anschließend wird 3 mal mit 5 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten. Die Abspaltlösungen werden gepoolt, eingedampft und 30 Minuten in 2,5 ml Trifluoressigsäure gerührt. Dann wird in 20 ml Ether präzipitiert, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 10 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 332 mg Peptid erhalten.

25

Ausbeute: 23,9 % d.Th. über alle Stufen,
33,0 % bezogen auf die Abspaltung

30

Beispiel 3: Disulfid-Oxidation mit Thallium-trifluoracetat

Y
K
5
Zunächst wird eine Festphasensynthese wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, jedoch an einem BHA-PS (Beladung 1 mmol/g) das mit MEOBP-Linker beladen wird. Es wird FmocCys(Acm) statt Fmoc-Cys(Trt) verwendet.

136 mg $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ werden in 1 ml N.N-Dimethylformamid gelöst (Oxidationslösung), 0,5 g polymergebundenes Peptid (0,38 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) werden 5 Minuten mit 3 ml N.N-Dimethylformamid geschüttelt, dann werden 0,725 ml Oxidationslösung zugegeben. Nach 30 minütigem Schütteln bei 25°C wird abgesaugt, und mit je 5 ml der folgenden Lösungsmittel gewaschen: 3x N.N-Dimethylformamid, 3x MeOH, 1 x 10 % HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x H_2O , 3 x 10 % HAc in MeOH, 3 x 10 % HAc in H_2O , 3 x N.N-Dimethylformamid, 3 x MeOH, 3 x H_2O , 3 x MeOH. Es wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 420 mg (0,40 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

20

Es werden 0,25 ml Triethylsilan mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt (Abspaltreagenz). 0,4 g polymergebundenes Peptid werden 30 Minuten mit 3 ml Abspaltreagenz geschüttelt, dann wird abgesaugt und 2,5 ml Abspaltreagenz zugegeben. Nach 30 minütigem Schütteln wird abgesaugt, und das Harz noch 1 und 2 Stunden mit je 2,5 ml Abspaltreagenz behandelt. Die Filtrate werden eingedampft, mit je 3 ml Ether verrieben, die dabei anfallenden Niederschläge werden über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 2 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden insgesamt 119 mg Peptid erhalten.

30

Ausbeute: 8,6 % d.Th. über alle Stufen,
8,6 % bezogen auf die Abspaltung

Beispiel 4: Synthese von TT232 in Lösung1. Ddz-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

5 In einem 1L-Rundkolben werden 22,8 g (55 mMol) Ddz-Cys(Acm) und 9,32 g (60 mMol) HOBT in 300 mL Ethylacetat gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 18,46 g (57,5 mMol) TBTU und 27,45 mL (0,25 Mol) NMM gegeben. Nach weiterem 5 minütigem Rühren erfolgt Zugabe von 8,71 g (50 mMol) Thr(tBu)-NH₂. Es wird über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung
10 wird mit 150 mL Benzin versetzt und mit 1 x 100 mL VE-Wasser, 3 x 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 100 mL VE-Wasser, 3 x 100 mL 0,1N HCl, 1 x 100 mL Brine und 1 x 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über 10 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 25,2 g
15 amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 88 % d.Th.).

2. TFA *Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

18,3 g (32 mMol) Ddz-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 200 mL 5 %
20 Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 200 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 100 mL Ethylacetat codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum in einer Mischung aus 30 mL VE-Wasser, 15 mL Ethylacetat und 30 mL
25 Diethylether aufgenommen. Die Phasen werden im Scheidetrichter getrennt, die organische Phase wird noch 2x mit je 10 mL VE-Wasser extrahiert. Die vereinigten Wasserphasen werden mit 3 x 10 mL Ethylacetat/ Diethylether 1 : 2 (v/v) gewaschen und lyophilisiert. Es werden 11,8 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 80 % d.Th.).

3. Ddz-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 12 g (26 mMol) TFA * Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂, 14,34 g (28,5 mMol) Ddz-Lys(Z) und 4,84 g (31,1 mMol) HOBt in 100 mL Ethylacetat gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 9,58 g (29,8 mMol) TBTU und 14,3 mL (0,13 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt. Die klare Reaktionslösung wird mit ca. 50 mL Benzin versetzt und mit 1 x 50 mL VE-Wasser, 3 x 50 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 50 mL VE-Wasser, 3 x 50 mL 0,1N HCl, 1 x 50 mL VE-Wasser und 12 x 20 mL 3 % NaCO₃-Lösung gewaschen, über 5 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 21,9 g glasartig erstarrendes Produkt erhalten (Ausbeute: 100 % d.Th.).

4. TFA * Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

6 g (7,2 mMol) Ddz-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 40 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 40 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 40 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Es werden 3 g Schaum erhalten (Ausbeute: quant.).

5. Ddz-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

Freisetzung von Ddz-D-Trp aus dem DCHA-Salz:

6,56 g (11 mMol) Ddz-D-Trp * DCHA werden in 20 mL Ethylacetat suspendiert und im Scheidetrichter mit 3 x 20 mL 0,1N HCl und 2 x 10 mL VE-Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft.

- 24 -

In einem Rundkolben werden 5,22 g (7,2 mMol) TFA*Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ das oben erhaltene Ddz-D-Trp und 1,57g (10mMol) HOBT in 40 mL DME gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 3,0 g (9,4 mMol) TBTU und 3,4 mL (0,031 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt.

5 Die klare Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in 40 mL Ethylacetat aufgenommen und mit ca. 10 mL Benzin versetzt. Dann wird mit 1 x 20 mL VE-Wasser und 1 x 20 mL 3 % Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Das Produkt fällt aus, wird abgesaugt und mit PE/EE 2 : 1 gewaschen. Nach Trocknen
10 im Hochvakuum werden 4,3 g Produkt erhalten (Ausbeute: 65% d.Th.).

6. TFA* D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

11,2 g (11 mMol) Ddz-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 64
15 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 64 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 60 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit Ether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Hochvakuum
20 getrocknet. Es werden 10 g beiger Feststoff erhalten (Ausbeute: 100 %).

7. Ddz-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

Freisetzung von Ddz-Tyr(tBu) aus dem CHA-Salz:

25 7,38 g (13,2 mMol) Ddz-D-Trp*DCHA werden in 30 mL Ethylacetat suspendiert und im Scheidetrichter mit 3 x 30 mL 0,1N HCl und 2 x 20 mL VE-Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft.

In einem Rundkolben werden 10 g (11 mMol) TFA *D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂, das oben erhaltene Ddz-Tyr(tBu) und 2,39 g (15,4 mMol) HOBt in 80 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 4,59 g (14,3 mMol) TBTU und 6 mL (0,055 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Dann wird mit 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL kalter 0,1N HCl, 1 x 100 mL Brine und 3 x 20 mL 3 % Na₂CO₃-Lösung gewaschen, über ca. 5 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 11,8 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 87 % d.Th.).

8. TFA *Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

11,8 g (9,5 mMol) Ddz-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 50 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 50 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit Ether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 10,7 g beiger Feststoff erhalten (Ausbeute: 100 %).

9. Ddz-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 4,73 g (11 mMol) Ddz-Cys(Acm), 10,7 g (50 mMol) TFA *Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ und 2,07 g (13 mMol) HOBt in 75 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 3,97 g (12,4 mMol) TBTU und 5,2 mL (0,048 Mol) NMM gegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Ansatz am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in Ethylacetat

- 26 -

aufgenommen, und mit 1 x 30 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 20 mL 0,1N HCl, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung und 1 x 20 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 9,3 g Schaum erhalten (Ausbeute: 70 % d.Th.).

10. TFA*Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

8,9 g (6,3 mMol) Ddz-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 35 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 35 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 60 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 30 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 6,9 g Feststoff erhalten (Ausbeute: 84 %).

11. Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 640 mg (2,4 mMol) Boc-D-Phe, 2,61 g (2 mMol) TFA*Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ und 430 mg (2,8 mMol) HOBt in 10 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 830 mg (2,6 mMol) TBTU und 550 µl (10 mMol) NMM gegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Ansatz am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 x 10 mL VE-Wasser, 3 x 15 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 10 mL VE-Wasser, 3 x 10 mL 0,1N HCl, 1 x 10 mL ges. NaHCO₃-Lösung und 1 x 10 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar

und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 2,1 g amorpher Rückstand erhalten (Ausbeute: 73 % d.Th.).

12. TFA *D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Cys(Acm)-Thr-NH₂

5

1,44g (1 mMol) Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 7,5 mL Trifluoressigsäure gelöst und 16 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle wird in 75 mL Diethylether präzipitiert. Der Niederschlag wird abgesaugt, gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.
10 Es werden 1,26 g Pulver erhalten (Ausbeute: 88 %).

13. TT-232 Trifluoracetat

In einem 1L-Rundkolben werden 300 mL Essigsäure (96 %) vorgelegt,
15 0,215 g (0,15 mMol) TFA *D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Cys(Acm)-Thr-NH₂ werden unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit Argon entgast. Bei 22°C wird über einen Tropftrichter langsam eine Lösung von 92 mg (0,36 mMol) Jod in 6 mL MeOH zugetropft, bis die Reaktionslösung eine dauerhafte, leicht orange Farbe aufweist. Nach 1 h
20 wird so lange eine Lösung von 53 mg (0,3 mMol) Ascorbinsäure in 5 mL VE-Wasser zugegeben, bis die Reaktionslösung entfärbt ist. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 5 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 280 mg
25 Feststoff erhalten (HPLC-Vergleich mit einer Referenz zeigt einen Gehalt von 53 %).

Beispiel 5

30 Es wird entsprechend Beispiel 4 verfahren, die Knüpfung der Disulfidbrücke wird jedoch am geschützten Peptid vorgenommen.

1. tert Butyl-geschütztes TT232

Zu 100 mL Essigsäure (96 %) werden in einem Rundkolben 72 mg (0,05 mMol) Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit Argon entgast. Bei 22°C wird über einen Tropftrichter langsam eine Lösung von 92 mg (0,36 mMol) Jod in 6 mL MeOH zugetropft, bis die Reaktionslösung eine dauerhafte, leicht orange Farbe aufweist. Nach 1 h wird so lange eine Lösung von 53 mg (0,3 mMol) Ascorbinsäure in 5 mL VE-Wasser zugegeben, bis die Reaktionslösung entfärbt ist. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, der Rückstand wird in 5 mL Ethylacetat und 2 mL VE-Wasser aufgenommen, die organische Phase wird mit 3 x 2 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 2 mL VE-Wasser, 1 x 2 mL 0,1N HCl und 1 x 10 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Nach Trocknen im Hochvakuum werden 45 mg Rückstand erhalten (Ausbeute: 71 % d.Th.).

2. TT232 Trifluoracetat

39 mg (0,03 mMol) tert Butyl-geschütztes TT232 werden in 230 µL Trifluoressigsäure gelöst und 16 h bei RT gerührt. Dann wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 1 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 33 mg Produkt erhalten (Ausbeute: 77 %).

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT 232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase
10 abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Oxidation nach Aufbau des vollständigen Peptids bewirkt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Oxidation ein Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalz, Jod, ein Peroxid oder Sauerstoff, und insbesondere Jod in essig-saurer Lösung oder N,N-Dimethylformamid verwendet.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

- 30 -

daß man als Festphase ein eine säurelabile Ankergruppierung aufweisendes Polystyrol verwendet.

- 5 6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die säurelabile Ankergruppierung eine Xanthyl- oder eine MEOBP-Gruppe umfaßt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Synthese Aminosäuren verwendet, die durch eine Fmoc-Gruppierung an der Aminogruppe und durch tertiäre Butylgruppen an den Seitenketten geschützt sind.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Sulfhydryl-Gruppen enthaltende Aminosäuren ebenfalls mit Schutzgruppen versehen verwendet.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Abspaltung des Peptids vom Polymer und die Abspaltung der Schutzgruppen gleichzeitig bewirkt.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Aufreinigung des hergestellten Peptids nach Abtrennung von der Festphase durchgeführt wird.
- 30 11. Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids

unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchgeführt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/655	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/11032 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. März 2000 (02.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06131 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99) (30) Prioritätsdaten: PCT/EP98/05306 20. August 1998 (20.08.98) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPEGEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRODUKTION MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Günther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemünd (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenrichts: 14. September 2000 (14.09.00)
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOSTATIN (TT-232 TRIACETATE) AND ANALOGS THEREOF		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOSTATIN (TT-232 TRIACETAT) UND SEINE ANALOGA		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to a method for synthesising biostatin (TT 232) by means of solid phase synthesis on a polymer support, by gradually building up the peptide using amino acids derivatized with protective groups. According to said method, the protective groups are split off and the peptide is detached from the solid phase. The disulphide bond is closed through the oxidation of the completely or partially built up peptide in the presence of a suitable solvent for as long as the peptide remains bound to the solid phase. The invention also relates to a method for synthesising biostatin (TT232) by means of peptide synthesis in solution.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt. Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/06131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/655

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30 September 1992 (1992-09-30) cited in the application see especially the synthesis described in example 1 together with example 3 ---	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 19, 11 May 1998 (1998-05-11) Columbus, Ohio, US; abstract no. 230702, H UNO & S KANAOKA: "preparation of cyclic peptides" XP002103315 & JP 10 067796 A (SUMITOMO) 10 March 1998 (1998-03-10) abstract --- -/--	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2000

Date of mailing of the international search report

28/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 44, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP the whole document ---	1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., vol. 30, no. 18, 1989, pages 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB the whole document ---	1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15 October 1980 (1980-10-15) the whole document -----	11-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/06131

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/06131

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 505680 A	30-09-1992	HU 60752 A AT 121753 T CA 2060034 A DE 69202182 D DE 69202182 T ES 2074294 T FI 920340 A JP 2514518 B JP 5163299 A US 5480870 A	28-10-1992 15-05-1995 26-07-1992 01-06-1995 31-08-1995 01-09-1995 26-07-1992 10-07-1996 29-06-1993 02-01-1996
JP 10067796 A	10-03-1998	NONE	
EP 17536 A	15-10-1980	FR 2451915 A CA 1137467 A DE 3062396 D JP 55162754 A US 4337194 A	17-10-1980 14-12-1982 28-04-1983 18-12-1980 29-06-1982

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/655

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30. September 1992 (1992-09-30) in der Anmeldung erwähnt see especially the synthesis described in example 1 together with example 3 ---	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 19, 11. Mai 1998 (1998-05-11) Columbus, Ohio, US; abstract no. 230702, H UNO & S KANAOKA: "preparation of cyclic peptides" XP002103315 & JP 10 067796 A (SUMITOMO) 10. März 1998 (1998-03-10) Zusammenfassung --- -/-	1-5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

² Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 44, Nr. 5, Mai 1996 (1996-05), Seiten 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP das ganze Dokument	1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., Bd. 30, Nr. 18, 1989, Seiten 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB das ganze Dokument	1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15. Oktober 1980 (1980-10-15) das ganze Dokument	11-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 505680 A	30-09-1992	HU 60752 A	28-10-1992
		AT 121753 T	15-05-1995
		CA 2060034 A	26-07-1992
		DE 69202182 D	01-06-1995
		DE 69202182 T	31-08-1995
		ES 2074294 T	01-09-1995
		FI 920340 A	26-07-1992
		JP 2514518 B	10-07-1996
		JP 5163299 A	29-06-1993
		US 5480870 A	02-01-1996
JP 10067796 A	10-03-1998	KEINE	
EP 17536 A	15-10-1980	FR 2451915 A	17-10-1980
		CA 1137467 A	14-12-1982
		DE 3062396 D	28-04-1983
		JP 55162754 A	18-12-1980
		US 4337194 A	29-06-1982


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/655	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/11032 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. März 2000 (02.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06131 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1999 (20.08.99) (30) Prioritätsdaten: PCT/EP98/05306 20. August 1998 (20.08.98) EP (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ORPE- GEN PHARMA GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOL- OGISCHE FORSCHUNG, ENTWICKLUNG UND PRO- DUKTION MBH [DE/DE]; Czemyring 22, D-69115 Hei- delberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUM, Günther [DE/DE]; Jakobsgasse 1, D-69214 Eppelheim (DE). LIFFERTH, Axel [DE/DE]; Keplerstrasse 23, D-69207 Sandhausen (DE). BIRR, Christian [DE/DE]; Bahnhofstrasse 130, D-69151 Neckargemünd (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- richts: 14. September 2000 (14.09.00)
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOSTATIN (TT-232 TRIACETATE) AND ANALOGS THEREOF (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOSTATIN (TT-232 TRIACETAT) UND SEINE ANALOGA (57) Abstract The invention relates to a method for synthesising biostatin (TT 232) by means of solid phase synthesis on a polymer support, by gradually building up the peptide using amino acids derivatized with protective groups. According to said method, the protective groups are split off and the peptide is detached from the solid phase. The disulphide bond is closed through the oxidation of the completely or partially built up peptide in the presence of a suitable solvent for as long as the peptide remains bound to the solid phase. The invention also relates to a method for synthesising biostatin (TT232) by means of peptide synthesis in solution. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt. Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung von BIOSTATIN (TT-232 Triac tat) und seine Analoga

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Biostatin mittels Festphasensynthese.

10

Zur Synthese von Peptiden sind dem Fachmann verschiedene Verfahren bekannt. Es handelt sich dabei zum einen um Flüssigphasenmethoden, welche auf Shemyakin (Tetrahedron Lett. (1965), 2323 f.) zurückgehen, und zum anderen um Festphasenverfahren, welche erstmals von Merrifield (R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2149) beschrieben wurden.

15

20

25

Die Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasensynthese sind seither weiterentwickelt und erheblich verbessert worden, es wird hierzu beispielsweise auf "Peptide, Chemie und Biologie", Hans Dieter Jakubke, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford, 1996, ISBN 3-8274-0000-7 verwiesen. Dieses Lehrbuch beschreibt Methoden der klassischen als auch der Merrifield-Peptid-Synthese. Derzeit wird zur Peptidsynthese in erster Linie die Peptidsynthese in Lösung angewandt. Insbesondere bei der Synthese von Peptiden, welche mindestens eine Disulfidbrücke ausbilden sollen, besteht im Hinblick auf die Synthese in Lösung allerdings der der Methode inhärente Nachteil, daß diese Disulfidbrücke durch Oxidation in hoher Verdünnung gebildet werden muß. Dies ist im klassischen Verfahren der Peptidsynthese in Lösung nötig, um die erforderliche örtliche Trennung der einzelnen Reaktionszentren zu bewirken und damit eine effektive Cyclisierung zu ermöglichen.

30

Das Peptid Biostatin (TT-232) ist ein Analogon des Somatostatins und weist starke in vitro und in vivo Antitumoraktivität auf.

- 2 -

Somatostatin ist ein natürlich vorkommendes Tetradecapeptid, welches die Bildung von Wachstumshormon und die Sekretion weiterer endokriner Moleküle, wie z.B. Glucagon, Insulin und Gastrin, inhibiert. Somatostatin inhibiert oder reguliert einige Zellfunktionen und es wurde darüber hinaus
5 festgestellt, daß es wichtige endogene antiproliferative Aktivität entfaltet. Es wurde außerdem ein inhibitorischer Effekt von Somatostatin und seinen Analoga auf Tumoren gezeigt. In den letzten Jahren wurden einige Somatostatinanaloga entwickelt, welche längere Wirkungszeiten als das native Hormon und bessere Antitumorwirksamkeit aufweisen. Es wurde
10 daher viel Mühe aufgewandt, tumorselektive Somatostatinanaloga zu entwickeln, wobei insbesondere auch die leichte Herstellbarkeit eine Rolle spielt.

Eines dieser Analoga ist ein Molekül mit einer 5-Ringstruktur mit der
15 folgenden Sequenz:

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂.

Das Molekül wurde TT-232 bzw. Biostatin genannt. Dieses Somatostatin-analogon hat praktisch keinen inhibitorischen Effekt auf die Wachstumshormonsfreisetzung, zeigt aber starke Antitumorwirksamkeit in vivo und in vitro
20 und induziert die Apoptose. Die Verbindung inhibiert die Tyrosinkinase-Aktivität verschiedener menschlicher Darmtumorzelllinien, wobei diese Inhibition sehr gut mit der beobachteten Inhibition der Zellproliferation übereinstimmte.

25 Die Herstellung von Octa- bzw. Heptapeptid-Derivaten wird beispielsweise in der EP-A-O 505 680 beschrieben. Dort wird aber für eine effektive Cyclisierung über die beiden Cystein-Reste das Peptid zuerst von der festen Phase abgetrennt, die Lösung stark verdünnt und dann die Oxidation
30 bewirkt. Diese Art der Herstellung erfordert aber weitere Aufkonzentrations- und Reinigungsschritte.

- 3 -

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Verfahren bereitzustellen, durch welches Biostatin besonders leicht und mit besonders hoher Ausbeute an freigesetztem Peptidamid nach der Disulfidoxidation erhalten werden kann.

5

Eine weitere Aufgabe war es, die Herstellung von Biostatin in einer solchen Weise zu ermöglichen, daß eine leichte Aufarbeitung des erhaltenen Produkts erfolgen kann.

10 Gelöst werden diese Aufgaben zur Synthese von Biostatin (TT 232) in einem ersten erfindungsgemäßen Verfahren durch Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase abgelöst
15 wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.

20 Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens angewandte Festphasensynthese kann in dem Fachmann an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Die hierfür geeigneten Festphasenmaterialien, die benötigten Reagenzien, Puffer, Reaktionsbedingungen und einzusetzenden Schutzgruppen für die Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert auf der Feststellung, daß die örtliche Trennung der Reaktionszentren bei der Bildung der Disulfidbrücken in Biostatin in ausreichender Weise gewährleistet ist, wenn die Oxidation erfolgt, solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden ist.

30

Im Rahmen der Erfindung ist es sowohl möglich, direkt nach Synthese desjenigen Teils von Biostatin, welcher die zu verbrückenden Sulfhydryl-

- 4 -

gruppen enthält, eine Oxidation und damit Ausbildung der Disulfidbrücke zu bewirken, und dann das Peptid fertig zu synthetisieren, als auch zuerst das vollständige Peptid zu synthetisieren und danach die Oxidation durchzuführen. Maßgeblich ist jedoch, daß die Oxidation erfolgen muß, solange das Peptid festphasen-gebunden vorliegt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen des Peptids durchzuführen.

Zur Oxidation können alle auch bisher bereits für in Lösung durchgeführte Verfahren bekannte Oxidationsmittel eingesetzt werden. Geeignete Oxidationsmittel sind dem Fachmann daher bekannt. Beispiele für derartige Oxidationsmittel sind Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalze, Jod, Peroxide oder Sauerstoff. Diese Oxidationsmittel werden in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches angewandt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird besonders bevorzugt als Oxidationsmittel Jod, beispielsweise in essigsaurer Lösung oder in einem Lösungsmittel auf Basis von N,N-Dimethylformamid eingesetzt.

Nach abgeschlossener Oxidation erfolgen Waschungen des polymergebundenen Peptids mit verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen. Hierzu können z.B. N,N-Dimethylformamid, Methanol, Essigsäure und Wasser oder aber auch Lösungen von komplexierenden Reagenzien oder Reduktionsmitteln, wie insbesondere Thiosulfat oder Ascorbinsäure eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft an einer festen Phase durchgeführt, welche eine säurelabile Ankergruppe (acid labile anchoring bond, ALAB) aufweist. Besonders bevorzugt wird als feste Phase ein Polymer, insbesondere Polystyrol, eingesetzt. Vorteilhaft können auch modifizierte Harze verwendet werden, wie Aminomethylpolystyrol (AMPS),

Benzhydrylamin-(BHA-PS) und Methylbenzhydrolamino-polystyrol (MBHA-PS). Die feste Phase kann dabei in für die Festphasensynthese üblicher Form eingesetzt werden. Bevorzugt wird die Festphase in Form von Kügelchen, sogenannter "Beads", eingesetzt.

5

Geeignete Ankergruppen sind in der Festphasenchemie übliche Anker, welche die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger in einfacher Weise erlauben. Besonders bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung Ankergruppen, welche die Abspaltung des Peptids als Amid ermöglichen.

10

Beispielhafte mit einer säurelabilen Ankergruppe derivatisierte Polymere (ALAB-P) sind 5-(9-amino)xanthen-2-yl-oxyveryl-4'-methyl-benzhydrylamino-polystyrol und 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-aminomethyl-phenoxyacetyl-4''-methyl benzhydrylamino-polystyrol.

15

Besonders bevorzugte Ankergruppierungen sind desweiteren 4-Hydroxymethyl-benzoesäure (HBMA), 9-Amino-xanthenyl-3-hydrol (Xant) oder p[(R,5)- α -(1-(9H-Fluoren-9-yl)methoxyformamido)-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxy-essigsäure [MEOBP]. Am meisten bevorzugt sind im Rahmen der Erfindung die Xant- und die MEOBP-Gruppierung.

20

Die Synthese wird im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt mit der Fmoc-/tert. Butyl-Strategie durchgeführt. Dies bedeutet, daß die zum Aufbau des Peptids benötigten Aminosäuren an der Aminogruppe mit einer Fmoc-Schutzgruppe und an den Seitenkettengruppierungen mit tert. Butylgruppen derivatisiert sind. Die Fmoc-Schutzgruppe ist dabei eine temporäre Schutzgruppe, da sie bei der Ausbildung des Peptids abgespalten wird, und lediglich eine Fmoc-Gruppe am N-Terminus des synthetisierten, festphasengebundenen Peptids verbleibt.

25

30

Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine werden vorteilhaft mit Trityl- oder Acmschutzgruppen derivatisiert. Es ist außerdem besonders bevorzugt, die N-

- 6 -

terminal letzte Aminosäure im Sequenzaufbau als N-alpha Boc-geschützt s Aminosäurederivat einzusetzen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Syntheseverfahrens werden die folgenden Schritte durchlaufen:

1. Beladung des polymeren Trägers mit dem Anker und/oder dem ersten Aminosäurederivat
2. Aufbau der Peptidsequenz
3. Knüpfung der Disulfidbrücke
4. Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger und/oder der Schutzgruppenabspaltung
5. Schutzgruppenabspaltung (sofern nicht bereits unter 4. erfolgt).

Zur Abspaltung der im synthetisierten Peptid enthaltenen Schutzgruppen können literaturbekannte Methoden, z.B. Zugabe von verdünnter Piperidinlösung, angewandt werden.

Die Abspaltung der Peptide vom polymeren Träger erfolgt ebenfalls nach an sich bekannten Methoden. Im Fall der säurelabilen Ankergruppen erfolgt die Abspaltung sauer, besonders bevorzugt mit konzentrierter oder verdünnter Trifluoressigsäure.

Die Abspaltung der Schutzgruppen der von der Festphase gelösten Peptide erfolgt in der Regel ebenfalls durch Säurezugabe, bevorzugt wiederum mittels Trifluoressigsäure. Nach der Abspaltung der Peptide können gewünschtenfalls weitere Reinigungs- oder/und Konzentrationsschritte durchgeführt werden. Eine Reinigung kann hierbei vorteilhaft mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die Synthese gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geht in einer besonders bevorzugten Ausführungsform von Fmoc-Threonin(tert.butyl-

ether)amid aus, welches kovalent an eine Polystyrol-Festphase über eine säurelabile Xanthenyl-Ankergruppierung gebunden ist.

In der Folge werden die einzelnen geschützten Aminosäuren zugegeben unter Bildung eines Festphasen-gebundenen geschützten Peptids. Zur Ausbildung der Disulfidbrücke wird das Heptapeptid sodann an der Festphase durch Zugabe von Jod/N,N-Dimethylformamid oder Essigsäure oxidiert und das cyclisierte Heptapeptid durch Säurebehandlung vom Träger abgelöst. Gleichzeitig werden alle Schutzgruppen an Seitenketten des Peptids abgespalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen des Produkts erhalten wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine im Vergleich zum Stand der Technik sehr effektive und einfache Herstellung von Biostatin mittels Peptidsynthese in Lösung. Insbesondere bei der bevorzugten Verfahrensführung unter Verwendung von mit Ddz (3,5-Dimethoxybenzyl- α,α -dimethyloxycarbonyl oder 2[(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-oxycarbonyl]-propyl) als Schutzgruppe derivatisierten Aminosäuren zum Peptidaufbau können hohe Ausbeuten des Produkts auf einfache Weise erhalten werden. Das erfindungsgemäße Verfahren weist außerdem den Vorteil auf, daß nach vollendetem Peptidaufbau in leichter Weise die Oxidation erfolgen kann. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt, die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchzuführen, allerdings ist eine Verfahrensführung mit Abspaltung der Schutzgruppen vor der Oxidation

- 8 -

ebenfalls möglich, auch wenn die Ausbeuten mit dieser Variante etwas geringer sind.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß nach erfolgter Oxidation und damit intramolekularem Ringschluß über die beiden Cystein-Reste die Reaktionslösung abgedampft werden kann und auf diese Art und Weise das Produkt erhalten wird. Gegebenenfalls wird das Produkt noch gewaschen, z.B. mit Ether, und danach erneut abgesaugt und getrocknet.

Im erfindungsgemäßen Verfahren sind vorzugsweise die folgenden Syntheseschritte nacheinander durchzuführen:

1. Kopplung von Ddz-geschütztem Cys (Acm) an tert.-Butyl-geschütztes Threoninamid
2. Ersatz der Schutzgruppe Ddz durch Trifluoressigsäure,
3. Anfügen eines Ddz-geschützten Lysin (Z),
4. Ersatz der Ddz-Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure
5. Anfügung des Ddz-geschützten D-Trp
6. Entfernung der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
7. Anfügung des Ddz-geschützten Tyr (Tbu)
8. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe und Ersatz durch Trifluoressigsäure
9. Anfügen des Ddz-geschützten Cys (Acm)
10. Entfernen der Ddz-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
11. Anfügen des Boc-geschützten D-Phe
12. Ersatz des Boc durch Trifluoressigsäure
13. Oxidation und Aufarbeitung des Produkts durch Abdampfen des Lösungsmittels und Waschen.

In bevorzugten Ausführungsformen wird die Oxidation mit dem voll geschützten Peptid durchgeführt, wogegen in der anderen Ausführungsform in Schritt 11 teilweise bereits die Schutzgruppen entfernt werden, so daß lediglich die Acm-Gruppen am Cystein verbleiben.

Das erfindungsgemäße Verfahren, welches ein zweiter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, ermöglicht eine einfache Peptidsynthese in Lösung, bei der sowohl die Oxidation als auch die Aufarbeitung sehr leicht durchzuführen sind. Durch Oxidation des noch tert.-Butyl-geschützten Biostatins wird eine besonders hohe Ausbeute von ca. 70 bis 80 % der Theorie erhalten.

Weitere Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens können aus den Beispielen 4 und 5 ersehen werden.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern.

Beispiel 1:

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

395g Fmoc-MEOBP-MBHA-Harz (Beladung 0,84 mmol/g) werden unter Verwendung von 1,5 l N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt und durch Taumeln gemischt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Die Taumbewegung wird während aller Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 1,5 l N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 30 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 1,5 l 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 267,1 g (672 mmol) Fmoc-Thr(tBu) in 375 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt) in 375 N.N-Dimethylformamid, 104,4g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol) Fmoc-Cys(Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol)

- 11 -

HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie
5 Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

10 Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5)
15 werden folgende Lösungen vorbereitet: 314,9 g (672 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von
20 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 157,4 g (336 mmol) Fmoc-Lys(Boc) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol)
25 HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es
30 werden 4 DMFWaschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

5 Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden folgende Lösungen vorbereitet: 286,8 g (672 mmol) Fmoc-D-Trp in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml
10 N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der
15 Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 143,3 g (336 mmol) Fmoc-D-Trp in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß
20 gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

25 Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

30

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden folgende Lösungen vorbereitet: 308,8 g (672 mmol) Fmoc-Tyr(tBu)

- 13 -

in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von
5 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 154,4 g (336 mmol) Fmoc-Tyr(tBu) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol)
10 HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es
15 werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

20

Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 393,6 g (672 mmol) Fmoc-Cys (Trt)
25 in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe
30 entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 196,8 g (336 mmol)

Fmoc-Cys (Trt) in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 375 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden
5 Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

10

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten

Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

15 Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden folgende Lösungen vorbereitet: 178,3 g (672 mmol) Boc-D-Phe in 500 ml N.N-Dimethylformamid, 104,4 g (672 mmol) HOBt*H₂O in 250 ml N.N-Dimethylformamid und 215,8 g TBTU in 750 ml N.N-Dimethylformamid. Die vorbereiteten Lösungen werden in das Reaktionsgefäß zu dem
20 deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 228,7 ml DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt unvollständigen Umsatz, es wird eine Nachkupplung unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt: 89,1 g (336 mmol) Boc-
25 D-Phe in 250 ml N.N-Dimethylformamid, 52,2 g (336 mmol) HOBt*H₂O in 125 ml N.N-Dimethylformamid und 107,9 g TBTU in 400 ml N.N-Dimethylformamid. Diese Lösungen werden in das Reaktionsgefäß gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 114,3 ml DIEA. Nach 1 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen
30 untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 4 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

- 15 -

Stufe 15, Umsetzung mit Boc_2O

Das aus Stufe 14 resultierende Produkt wird mit 4 l N.N-Dimethylformamid versetzt und 20 Minuten agitiert. Dann werden 400 g Boc_2O zugegeben, nach 5 Minuten werden in 5 Minuten Abstand 3 Portionen DIEA a 200 ml zugegeben. Nach 1000 Minuten wird abgesaugt, es folgen 5 DMF-Waschschritte (s.o.) a 3 l und 3 analoge MeOH-Waschschritte wobei jeweils 2,5 l MeOH eingesetzt werden. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 833 g polymergebundenes Peptid erhalten.

Stufe 16, Knüpfung der Disulfidbrücke

Zu 833 g polymergebundenem Peptid (0,37 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 15 wird eine Lösung von 416,5 g Jod in 6 l N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 8 l N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 8 l. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l 10 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 Waschschritte mit einer Mischung aus 8 l N.N-Dimethylformamid und 2 l Wasser sowie 2 DMF-Waschschritte a 8 l. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 672,4 g (0,45 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) .

Stufe 17, Abspaltung vom Polymer

Zu 672,4 g polymergebundenem Peptid aus Stufe 16 wird eine Lösung von je 120 ml m-Cresol und Wasser in 6 l Trifluoressigsäure (Abspaltreagenz) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach saugt man ab und versetzt das Harz erneut mit Abspaltreagenz. Die erste Nachspaltung wird nach 30 Minuten abgesaugt, es folgen Nachspaltungen

- 16 -

von einer bzw. zwei Stunden Dauer. Die jeweiligen Filtrate werden am Rotationsverdampfer bei 30°C Wasserbadtemperatur im Wasserstrahlvakuum eingedamft. Der Rückstand wird mit 3 l Ether verrührt, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 1,5 l Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden insgesamt 231,85 g Peptid erhalten.

Ausbeute: 13,4% d.Th. über alle Stufen, 14,8% bezogen auf die Abspaltung

Beispiel 2:

Stufe 1, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Linker

3,64 g Fmoc-XANT-Harz (Beladung 0,55 mmol/g) werden unter Verwendung von 25 ml N.N-Dimethylformamid in ein mit einer Bodenfritte versehenes Reaktionsgefäß überführt, geschüttelt; nach 5 Minuten wird abgesaugt. Das Schütteln wird während allen Wasch- und Reaktionsschritten aufrechterhalten. Es folgt ein DMF-Waschschritt, dazu werden 25 ml N.N-Dimethylformamid in das Reaktionsgefäß gefüllt, nach 5 Minuten wird das N.N-Dimethylformamid abgesaugt. Es werden 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und erneut 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 25 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt und 25 ml 50 % Piperidin in N.N-Dimethylformamid (v/v) zugegeben. Nach 5 Minuten wird die Piperidinlösung abgesaugt, anschließend werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 2, Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 1) werden 2,39 g (6 mmol) Fmoc-Thr(tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt·H₂O und

- 17 -

2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 1) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 3, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 1 beschrieben abgespalten, wobei bei dem DMF-feuchten Harz auf den einleitenden Quellvorgang verzichtet wird.

Stufe 4, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 3) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys (Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 3) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 5, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 6, Kupplung von Fmoc-Lys(Boc)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 5) werden 2,81 g (6 mmol) Fmoc-Lys(Boc), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und

2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 5) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 mL (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 7, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 8, Kupplung von Fmoc-D-Trp

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 7) werden 2,56 g (6 mmol) Fmoc-D-Trp, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 7) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 9, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

Stufe 10, Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 9) werden 2,76 g (6 mmol) Fmoc-Tyr (tBu), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer

(Stufe 9) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

5

Stufe 11, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

10 Stufe 12, Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 11) werden 3,51 g (6 mmol) Fmoc-Cys(Trt), 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 11) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

15

20 Stufe 13, Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wird wie unter Stufe 3 beschrieben abgespalten.

25 Stufe 14, Kupplung von Boc-D-Phe

Während der letzten DMF-Waschschritte der Fmoc-Abspaltung (Stufe 13) werden 1,59 g (6 mmol) Boc-D-Phe, 1,12 g (7,2 mmol) HOBt*H₂O und 2,12 g (6,6 mmol) TBTU in 15 ml N.N-Dimethylformamid gelöst. Diese Lösung wird in das Reaktionsgefäß zu dem deblockierten Linkerpolymer (Stufe 13) gegeben, dann erfolgt die Zugabe von 2,04 ml (12 mmol) DIEA. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wird eine Harzprobe entnommen, gewaschen

30

- 20 -

und auf freie Aminogruppen untersucht. Der Kaisertest zeigt vollständigen Umsatz, es werden 5 DMF-Waschschritte (s.o.) durchgeführt.

Stufe 15, Knüpfung der Disulfidbrücke

5

Zu 5 g polymergebundenem Peptid (0,30 mMol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat) aus Stufe 14 wird eine Lösung von 2,5 g Jod in 50 ml N.N-Dimethylformamid gegeben. Nach 60 Minuten wird abgesaugt und mit 50 ml N.N-Dimethylformamid versetzt. Nach 60 Minuten wird abgesaugt, es folgen 4 DMF-Waschschritte (s.o.) a 50 ml. Folgende Prozedur wird 3 mal durchgeführt: Es werden 16 ml N.N-Dimethylformamid und 4 ml 10 %ige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten wird abgesaugt, es folgen 3 DMF-Waschschritte. Anschließend wird je 3 mal mit Wasser, Methanol, Wasser und Methanol gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 4,1 g (0,34 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

15

Stufe 16, Abspaltung vom Polymer und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen

1 g polymergebundenes Peptid werden 10 mal für je 10 Minuten mit jeweils 5 ml 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan versetzt. Anschließend wird 3 mal mit 5 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgespalten. Die Abspalllösungen werden gepoolt, eingedampft und 30 Minuten in 2,5 ml Trifluoressigsäure gerührt. Dann wird in 20 ml Ether präzipitiert, über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal mit je 10 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 332 mg Peptid erhalten.

25

Ausbeute: 23,9 % d.Th. über alle Stufen,
33,0 % bezogen auf die Abspaltung

30

Beispiel 3: Disulfid-Oxidation mit Thallium-trifluoracetat

Zunächst wird eine Festphasensynthese wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, jedoch an einem BHA-PS (Beladung 1 mmol/g) das mit
5 MEOBP-Linker beladen wird. Es wird FmocCys(Acm) statt Fmoc-Cys(Trt) verwendet.

136 mg $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ werden in 1 ml N.N-Dimethylformamid gelöst (Oxidations-
lösung), 0,5 g polymergebundenes Peptid (0,38 mmol Peptid/g Peptid-Trä-
10 gerkonjugat) werden 5 Minuten mit 3 ml N.N-Dimethylformamid geschüttelt,
dann werden 0,725 ml Oxidationslösung zugegeben. Nach 30 minütigem
Schütteln bei 25°C wird abgesaugt, und mit je 5 ml der folgenden
Lösungsmittel gewaschen: 3x N.N-Dimethylformamid, 3x MeOH, 1 x 10 %
HAc in N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in
15 N.N-Dimethylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x 10 % HAc in N.N-Di-
methylformamid, 1 x 5 % EDTA in H_2O , 1 x H_2O , 3 x 10 % HAc in MeOH,
3 x 10 % HAc in H_2O , 3 x N.N-Dimethylformamid, 3 x MeOH, 3 x H_2O , 3
x MeOH. Es wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Auswaage 420
mg (0,40 mmol Peptid/g Peptid-Trägerkonjugat).

20 Es werden 0,25 ml Triethylsilan mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt
(Abspaltreagenz). 0,4 g polymergebundenes Peptid werden 30 Minuten mit
3 ml Abspaltreagenz geschüttelt, dann wird abgesaugt und 2,5 ml
Abspaltreagenz zugegeben. Nach 30 minütigem Schütteln wird abgesaugt,
25 und das Harz noch 1 und 2 Stunden mit je 2,5 ml Abspaltreagenz behan-
delt. Die Filtrate werden eingedampft, mit je 3 ml Ether verrieben, die dabei
anfallenden Niederschläge werden über eine P3-Fritte abgesaugt und 3 mal
mit je 2 ml Ether gewaschen. Nach 16 stündigem Trocknen im Hochvakuum
werden insgesamt 119 mg Peptid erhalten.

30

Ausbeute: 8,6 % d.Th. über alle Stufen,
8,6 % bezogen auf die Abspaltung

Beispiel 4: Synthese von TT232 in Lösung1. Ddz-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

5 In einem 1L-Rundkolben werden 22,8 g (55 mMol) Ddz-Cys(Acm) und 9,32 g (60 mMol) HOBT in 300 mL Ethylacetat gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 18,46 g (57,5 mMol) TBTU und 27,45 mL (0,25 Mol) NMM gegeben. Nach weiterem 5 minütigem Rühren erfolgt Zugabe von 8,71 g (50 mMol) Thr(tBu)-NH₂. Es wird über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung
10 wird mit 150 mL Benzin versetzt und mit 1 x 100 mL VE-Wasser, 3 x 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 100 mL VE-Wasser, 3 x 100 mL 0,1N HCl, 1 x 100 mL Brine und 1 x 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über 10 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 25,2 g
15 amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 88 % d.Th.).

2. TFA*Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

18,3 g (32 mMol) Ddz-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 200 mL 5 %
20 Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 200 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 100 mL Ethylacetat codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum in einer Mischung aus 30 mL VE-Wasser, 15 mL Ethylacetat und 30 mL
25 Diethylether aufgenommen. Die Phasen werden im Scheidetrichter getrennt, die organische Phase wird noch 2x mit je 10 mL VE-Wasser extrahiert. Die vereinigten Wasserphasen werden mit 3 x 10 mL Ethylacetat/ Diethylether 1 : 2 (v/v) gewaschen und lyophilisiert. Es werden 11,8 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 80 % d.Th.).

- 23 -

3. Ddz-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 12 g (26 mMol) TFA * Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂, 14,34 g (28,5 mMol) Ddz-Lys(Z) und 4,84 g (31,1 mMol) HOBt in 100 mL Ethylacetat gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 9,58 g (29,8 mMol) TBTU und 14,3 mL (0,13 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt. Die klare Reaktionslösung wird mit ca. 50 mL Benzin versetzt und mit 1 x 50 mL VE-Wasser, 3 x 50 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 50 mL VE-Wasser, 3 x 50 mL 0,1N HCl, 1 x 50 mL VE-Wasser und 12 x 20 mL 3 % NaCO₃-Lösung gewaschen, über 5 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 21,9 g glasartig erstarrendes Produkt erhalten (Ausbeute: 100 % d.Th.).

4. TFA * Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

6 g (7,2 mMol) Ddz-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 40 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 40 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 40 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Es werden 3 g Schaum erhalten (Ausbeute: quant.).

5. Ddz-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

Freisetzung von Ddz-D-Trp aus dem DCHA-Salz:

6,56 g (11 mMol) Ddz-D-Trp * DCHA werden in 20 mL Ethylacetat suspendiert und im Scheidetrichter mit 3 x 20 mL 0,1N HCl und 2 x 10 mL VE-Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft.

- 24 -

In einem Rundkolben werden 5,22 g (7,2 mMol) TFA*Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ das oben erhaltene Ddz-D-Trp und 1,57g (10mMol) HOBT in 40 mL DME gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 3,0 g (9,4 mMol) TBTU und 3,4 mL (0,031 Mol) NMM gegeben. Es wird über Nacht gerührt.

5 Die klare Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in 40 mL Ethylacetat aufgenommen und mit ca. 10 mL Benzin versetzt. Dann wird mit 1 x 20 mL VE-Wasser und 1 x 20 mL 3 % Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Das Produkt fällt aus, wird abgesaugt und mit PE/EE 2 : 1 gewaschen. Nach Trocknen

10 im Hochvakuum werden 4,3 g Produkt erhalten (Ausbeute: 65% d.Th.).

6. TFA* D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

11,2 g (11 mMol) Ddz-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 64

15 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 64 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 60 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit Ether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Hochvakuum

20 getrocknet. Es werden 10 g beiger Feststoff erhalten (Ausbeute: 100 %).

7. Ddz-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

Freisetzung von Ddz-Tyr(tBu) aus dem CHA-Salz:

25 7,38 g (13,2 mMol) Ddz-D-Trp*DCHA werden in 30 mL Ethylacetat suspendiert und im Scheidetrichter mit 3 x 30 mL 0,1N HCl und 2 x 20 mL VE-Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft.

In einem Rundkolben werden 10 g (11 mMol) TFA * D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂, das oben erhaltene Ddz-Tyr(tBu) und 2,39 g (15,4 mMol) HOBT in 80 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 4,59 g (14,3 mMol) TBTU und 6 mL (0,055 Mol) NMM gegeben.

5 Es wird über Nacht gerührt. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Dann wird mit 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL kalter 0,1N HCl, 1 x 100 mL Brine und 3 x 20 mL 3 % Na₂CO₃-Lösung gewaschen, über ca. 5
10 g Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 11,8 g amorphes Produkt erhalten (Ausbeute: 87 % d.Th.).

8. TFA * Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

15

11,8 g (9,5 mMol) Ddz-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 50 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend
20 mit 50 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit Ether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 10,7 g beiger Feststoff erhalten (Ausbeute: 100 %).

25

9. Ddz-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

30

In einem Rundkolben werden 4,73 g (11 mMol) Ddz-Cys(Acm), 10,7 g (50 mMol) TFA * Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ und 2,07 g (13 mMol) HOBT in 75 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten
Lösung werden 3,97 g (12,4 mMol) TBTU und 5,2 mL (0,048 Mol) NMM gegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Ansatz am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in Ethylacetat

- 26 -

aufgenommen, und mit 1 x 30 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 20 mL 0,1N HCl, 1 x 20 mL VE-Wasser, 3 x 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung und 1 x 20 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 9,3 g Schaum erhalten (Ausbeute: 70 % d.Th.).

10. TFA *Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

8,9 g (6,3 mMol) Ddz-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 35 mL 5 % Trifluoressigsäure in DCM gelöst und 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 35 mL Toluol wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft und anschließend mit 60 mL DME codestilliert. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 30 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 6,9 g Feststoff erhalten (Ausbeute: 84 %).

11. Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂

In einem Rundkolben werden 640 mg (2,4 mMol) Boc-D-Phe, 2,61 g (2 mMol) TFA *Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ und 430 mg (2,8 mMol) HOBT in 10 mL N,N'-Dimethylformamid gelöst. Zu der gerührten Lösung werden 830 mg (2,6 mMol) TBTU und 550 µl (10 mMol) NMM gegeben. Nach Rühren über Nacht wird der Ansatz am Rotationsverdampfer bei ca. 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 x 10 mL VE-Wasser, 3 x 15 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 10 mL VE-Wasser, 3 x 10 mL 0,1N HCl, 1 x 10 mL ges. NaHCO₃-Lösung und 1 x 10 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar

- 27 -

und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Es werden 2,1 g amorpher Rückstand erhalten (Ausbeute: 73 % d.Th.).

12. TFA*D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Cys(Acm)-Thr-NH₂

5

1,44g (1 mMol) Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ werden in 7,5 mL Trifluoressigsäure gelöst und 16 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle wird in 75 mL Diethylether präzipitiert. Der Niederschlag wird abgesaugt, gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 1,26 g Pulver erhalten (Ausbeute: 88 %).

10

13. TT-232 Trifluoracetat

In einem 1L-Rundkolben werden 300 mL Essigsäure (96 %) vorgelegt, 0,215 g (0,15 mMol) TFA*D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Cys(Acm)-Thr-NH₂ werden unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit Argon entgast. Bei 22°C wird über einen Tropftrichter langsam eine Lösung von 92 mg (0,36 mMol) Jod in 6 mL MeOH zugetropft, bis die Reaktionslösung eine dauerhafte, leicht orange Farbe aufweist. Nach 1 h wird so lange eine Lösung von 53 mg (0,3 mMol) Ascorbinsäure in 5 mL VE-Wasser zugegeben, bis die Reaktionslösung entfärbt ist. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 5 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 280 mg Feststoff erhalten (HPLC-Vergleich mit einer Referenz zeigt einen Gehalt von 53 %).

15

20

25

Beispiel 5

Es wird entsprechend Beispiel 4 verfahren, die Knüpfung der Disulfidbrücke wird jedoch am geschützten Peptid vorgenommen.

30

1. tert Butyl-geschütztes TT232

Zu 100 mL Essigsäure (96 %) werden in einem Rundkolben 72 mg (0,05 mMol) Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-D-Trp-Lys(Z)-Cys(Acm)-Thr(tBu)-NH₂ unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit Argon entgast. Bei 22°C wird über einen Tropftrichter langsam eine Lösung von 92 mg (0,36 mMol) Jod in 6 mL MeOH zugetropft, bis die Reaktionslösung eine dauerhafte, leicht orange Farbe aufweist. Nach 1 h wird so lange eine Lösung von 53 mg (0,3 mMol) Ascorbinsäure in 5 mL VE-Wasser zugegeben, bis die Reaktionslösung entfärbt ist. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft, der Rückstand wird in 5 mL Ethylacetat und 2 mL VE-Wasser aufgenommen, die organische Phase wird mit 3 x 2 mL ges. NaHCO₃-Lösung, 1 x 2 mL VE-Wasser, 1 x 2 mL 0,1N HCl und 1 x 10 mL VE-Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Nach Trocknen im Hochvakuum werden 45 mg Rückstand erhalten (Ausbeute: 71 % d.Th.).

2. TT232 Trifluoracetat

39 mg (0,03 mMol) tert Butyl-geschütztes TT232 werden in 230 µL Trifluoressigsäure gelöst und 16 h bei RT gerührt. Dann wird am Rotationsverdampfer bei ca. 20 mBar und 40°C Wasserbadtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird nach Trocknen im Hochvakuum mit 1 mL Ether verrieben, abgesaugt gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 33 mg Produkt erhalten (Ausbeute: 77 %).

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Synthese von Biostatin (TT 232) mittels Festphasensynthese an einem polymeren Träger durch stufenweises Aufbau des Peptids unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren, wonach die Schutzgruppen abgespalten und das Peptid von der Festphase
10 abgelöst wird, wobei die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird solange das Peptid noch an die feste Phase gebunden vorliegt.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Oxidation nach Aufbau des vollständigen Peptids bewirkt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Oxidation vor Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
 daß man zur Oxidation ein Silber-, Quecksilber- oder Thalliumsalz, Jod, ein Peroxid oder Sauerstoff, und insbesondere Jod in essig-saurer Lösung oder N,N-Dimethylformamid verwendet.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,

daß man als Festphase ein eine säurelabile Ankergruppierung aufweisendes Polystyrol verwendet.

- 5 6. Verfahren nach Anspruch 5,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die säurelabile Ankergruppierung eine Xanthyl- oder eine MEOBP-Gruppe umfaßt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man zur Synthese Aminosäuren verwendet, die durch eine Fmoc-Gruppierung an der Aminogruppe und durch tertiäre Butylgruppen an den Seitenketten geschützt sind.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 7,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man Sulfhydryl-Gruppen enthaltende Aminosäuren ebenfalls mit Schutzgruppen versehen verwendet.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man die Abspaltung des Peptids vom Polymer und die Abspaltung der Schutzgruppen gleichzeitig bewirkt.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß eine Aufreinigung des hergestellten Peptids nach Abtrennung von der Festphase durchgeführt wird.
- 30 11. Verfahren zur Herstellung von Biostatin (TT-232) mittels Peptidsynthese in Lösung durch stufenweisen Aufbau des Peptids

- 31 -

unter Verwendung von mit Schutzgruppen derivatisierten Aminosäuren,

dadurch gekennzeichnet,

5 daß die Disulfidbrücke durch Oxidation des vollständig oder teilweise aufgebauten Peptids in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels geschlossen wird und das Biostatin nach Entfernen des Lösungsmittels und gegebenenfalls Waschen erhalten wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11,

10 **dadurch gekennzeichnet,**

daß die Oxidation vor Abspaltung aller Schutzgruppen durchgeführt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,

15 **dadurch gekennzeichnet,**

daß als Schutzgruppen für eine oder mehrere der Aminosäuren Ddz verwendet wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/06131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/655

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30 September 1992 (1992-09-30) cited in the application see especially the synthesis described in example 1 together with example 3 ---	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 19, 11 May 1998 (1998-05-11) Columbus, Ohio, US; abstract no. 230702, H UNO & S KANAOKA: "preparation of cyclic peptides" XP002103315 & JP 10 067796 A (SUMITOMO) 10 March 1998 (1998-03-10) abstract --- -/--	1-5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2000

Date of mailing of the international search report

28/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 44, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP the whole document ---	1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., vol. 30, no. 18, 1989, pages 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB the whole document ---	1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15 October 1980 (1980-10-15) the whole document -----	11-13

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL ARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/06131

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 505680	A	30-09-1992	HU 60752 A	28-10-1992
			AT 121753 T	15-05-1995
			CA 2060034 A	26-07-1992
			DE 69202182 D	01-06-1995
			DE 69202182 T	31-08-1995
			ES 2074294 T	01-09-1995
			FI 920340 A	26-07-1992
			JP 2514518 B	10-07-1996
			JP 5163299 A	29-06-1993
			US 5480870 A	02-01-1996
JP 10067796	A	10-03-1998	NONE	
EP 17536	A	15-10-1980	FR 2451915 A	17-10-1980
			CA 1137467 A	14-12-1982
			DE 3062396 D	28-04-1983
			JP 55162754 A	18-12-1980
			US 4337194 A	29-06-1982

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/655

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 505 680 A (BIOSIGNAL) 30. September 1992 (1992-09-30) in der Anmeldung erwähnt see especially the synthesis described in example 1 together with example 3 ---	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 19, 11. Mai 1998 (1998-05-11) Columbus, Ohio, US; abstract no. 230702, H UNO & S KANAOKA: "preparation of cyclic peptides" XP002103315 & JP 10 067796 A (SUMITOMO) 10. März 1998 (1998-03-10) Zusammenfassung --- -/-	1-5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	M KAKIUCHI ET AL.: "Amino acids and peptides. XXVII. Solid phase synthesis of fibrinogen-related peptides with disulfide bond formed on solid support" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 44, Nr. 5, Mai 1996 (1996-05), Seiten 1107-1110, XP002103313 TOKYO JP das ganze Dokument	1-5
Y	C GARCIA-ECHEVERRIA ET AL.: "Convenient synthesis of a cyclic peptide disulfide: a type II beta-turn structural model" TETRAHEDRON LETTERS., Bd. 30, Nr. 18, 1989, Seiten 2441-2444, XP002103314 OXFORD GB das ganze Dokument	1-5
A	EP 0 017 536 A (CLIN-MIDY) 15. Oktober 1980 (1980-10-15) das ganze Dokument	11-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/06131

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 505680 A	30-09-1992	HU 60752 A	28-10-1992
		AT 121753 T	15-05-1995
		CA 2060034 A	26-07-1992
		DE 69202182 D	01-06-1995
		DE 69202182 T	31-08-1995
		ES 2074294 T	01-09-1995
		FI 920340 A	26-07-1992
		JP 2514518 B	10-07-1996
		JP 5163299 A	29-06-1993
		US 5480870 A	02-01-1996
JP 10067796 A	10-03-1998	KEINE	
EP 17536 A	15-10-1980	FR 2451915 A	17-10-1980
		CA 1137467 A	14-12-1982
		DE 3062396 D	28-04-1983
		JP 55162754 A	18-12-1980
		US 4337194 A	29-06-1982